



TITLE:

河川水中大腸菌の起源、病原性及び薬剤耐性に関する分子生物学的研究(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

五味, 良太

CITATION:

五味, 良太. 河川水中大腸菌の起源、病原性及び薬剤耐性に関する分子生物学的研究. 京都大学, 2016, 博士(工学)

ISSUE DATE:

2016-09-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19982>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により要約は2017-09-20に公開; 本学位論文は以下の学術論文に基づいて書かれたものである Gomi, R.; Matsuda, T.; Matsui, Y.; Yoneda, M., Fecal Source Tracking in Water by Next-Generation Sequencing Technologies Using Host-Specific Escherichia coli Genetic Markers. Environmental science & technology 2014, 48, (16), 9616-23. DOI: 10.1021/es501944c, Copyright 2014 American Chemical Society. Gomi, R.; Matsuda, T.; Fujimori, Y.; Harada, H.; Matsui, Y.; Yoneda, M., Characterization of Pathogenic Escherichia coli in River Water by Simultaneous Detection and Sequencing of 14 Virulence Genes. Environmental science & technology 2015, 49, (11), 6800-7. DOI: 10.1021/acs.est.5b00953, Copyright 2015 American Chemical Society. Gomi et al., Environmental science & technology, submitted for publication. Unpublished work copyright 2016 American Chemical Society.

京都大学	博士（工 学）	氏名	五味 良太
論文題目	河川水中大腸菌の起源、病原性及び薬剤耐性に関する分子生物学的研究		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>本論文は、河川水の細菌指標の中でも生物学的・臨床微生物学的に特に重要な大腸菌について、分子生物学的手法を用いてその起源を推定し、病原性や薬剤耐性を網羅的に測定する手法について検討したものであって、5章からなっている。</p> <p>第1章は序論であり、より正確な水系感染症のリスク評価を行う上での問題点を示すと共に、次の3つの研究目的を設定することで、本研究の位置付けを明らかにしている。1）大腸菌の由来動物種ごとに特異的な遺伝子マーカーを特定し、これらの遺伝子マーカーを標的として大和川から単離された大腸菌を対象としたマーカーの検出を行うことで、河川水中の大腸菌の起源を特定すること。2）大腸菌の病原遺伝子を一度に検出する手法を開発し、大和川から単離された大腸菌に手法を適用することで、大和川中の病原性大腸菌の存在実体を把握すること。3）大和川から単離した大腸菌株における薬剤耐性株の割合の同定、薬剤耐性決定因子や病原遺伝子の特定、系統解析による臨床分離株との比較を行い、健康リスクの増加への寄与の全体像をつかむこと。</p> <p>第2章は、第1章で設定した1つ目の目的についての成果をまとめている。まず起源既知のサンプル（ヒト、ウシ、ブタ、ニワトリ）から単離した大腸菌を対象として、次世代シーケンサーによるDNA塩基配列の解析により、それぞれの起源に特異的な遺伝子マーカーの探索を行った。その結果、ヒト特異的遺伝子マーカー4種（H8、H12、H14、H24）、ウシ特異的遺伝子マーカー2種（Co2、Co3）、ブタ特異的遺伝子マーカー3種（P1、P3、P4）、ニワトリ特異的遺伝子マーカー4種（Ch7、Ch9、Ch12、Ch13）を同定した。これらの特定された遺伝子マーカーを標的として、大和川から単離した531株の大腸菌株についてそれぞれの遺伝子マーカーの保有の有無を調べ、起源の推定を行った。その結果、大和川中の大腸菌は147株（27.7%）がヒト由来であると同定され、それに比較するとその他の起源由来と同定された株は少ないことがわかった（ウシ由来3.2%、ブタ由来7.0%、ニワトリ由来11.5%）。しかし、269株（50.7%）の大腸菌株はいずれの遺伝子マーカーも保有せず、起源の同定ができなかった。これには本研究で考慮していない起源由来の大腸菌株が存在した、遺伝子マーカーを同定する際に用いた起源既知の大腸菌30株がその起源の大腸菌の多様性を網羅していなかった、といった理由が考えられる。本章では河川水から直接DNAを抽出して遺伝子マーカーの検出を行った場合の、手法の妥当性についても検証した。その結果、河川水から直接DNAを抽出した場合は、大腸菌自体の濃度が低くこれらの遺伝子マーカーを定量できないため、大腸菌を培地で単離して遺伝子マーカーの検出を行う必要があることがわかった。</p> <p>第3章では、第1章で設定した2つ目の目的についての成果をまとめている。まず、マルチプレックス polymerase chain reaction (PCR) 及びデュアルインデックスシーケンシングを用いることで、主要な大腸菌の病原型（腸管出血性大腸菌、腸管病原性大腸菌、腸管侵入性大腸菌、毒素原性大腸菌、腸管凝集性大腸菌、腸管外病原性大腸菌、</p>			

京都大学	博士（工 学）	氏名	五味 良太
<p>分散接着性大腸菌、志賀毒素産生性大腸菌)の同定に必要な 14 種類の病原遺伝子を同時定量する手法を開発した。開発した手法を、第 2 章で解析した大腸菌株に適用し、それぞれの大腸菌株の病原性の有無やその病原型の同定を行った。その結果、7 株 (1%) が腸管病原性大腸菌、1 株 (0.2%) が腸管凝集付着性大腸菌、64 株 (12%) が腸管外病原性大腸菌であることがわかった。それ以外の 477 株 (87%) については病原型に分類される基準を満たす病原遺伝子が検出されず、従ってどの病原型にも分類されなかった。これらの大腸菌は、少なくとも病原遺伝子保有パターンによる病原性大腸菌の基準を満たしていないことから、病原性が低い株であったと考えられる。また、検出された病原遺伝子のほとんどが腸管外病原性大腸菌に関連する遺伝子であったことがわかった。このことから、腸管外病原性大腸菌と分類された 64 株について、第 2 章で同定した起源特異的遺伝子マーカーの検出を行ったところ、18 株 (28%) がヒト由来と分類された。また、その他の起源と分類された腸管外病原性大腸菌株は 2 株 (3%) のみであり、ヒトが大和川由来の腸管外病原性大腸菌株の主要な起源であることがわかった。腸管外病原性大腸菌は下水処理プロセスで死滅しない場合があることが知られているため、処理が不十分な下水が一つの起源として考えられた。腸管外病原性大腸菌は尿路感染症や菌血症の原因となり、高い薬剤耐性を示す株も存在するため、病院といった臨床現場だけでなく水環境という観点からも対策が必要であることが示唆された。</p> <p>第 4 章では、第 1 章で設定した 3 つ目の目的についての成果をまとめている。まず、大和川から単離した 531 株全ての大腸菌株について 25 種類の薬剤を用いた薬剤感受性試験を行った。その結果、76 株 (14.3%) が多剤耐性、66 株 (12.4%) が 1 剤もしくは 2 剤耐性、389 株 (73.3%) が感受性株と判断された。その後、薬剤感受性試験で多剤耐性と判断された大腸菌株全てと、非多剤耐性株をランダムに選択し、DNA を抽出後に全ゲノム配列の決定を行った。また、臨床微生物学的重要性から第 3 章で腸管外病原性大腸菌と判断された株についても全ゲノム配列の決定を行った。得られた 155 株の全ゲノム配列データを用いて、薬剤耐性決定因子の検出及びその系統について解析を行った。結果、50 以上の異なる薬剤耐性決定因子が検出され、環境水中の大腸菌は様々な薬剤耐性機構を保有していることがわかった。全ゲノム配列を決定した多剤耐性株 (n=66) については、ST155 complex (n=9)、ST10 complex (n=9)、ST69 complex (n=7) が多いことがわかった (ST = Sequence Type)。また、腸管外病原性大腸菌 (n=58) については、ST95 complex (n=18)、ST127 complex (n=8)、ST12 complex (n=6)、ST14 complex (n=6)、ST131 complex (n=6) といった臨床上問題となっている系統に属する菌株が多いことがわかった。特に ST95 complex に属する株について、臨床検体から分離された ST95 complex に属する大腸菌株との系統及び病原遺伝子保有パターンの比較を行ったところ、これらの 2 つのグループ間で有意な差を検出することができなかった。このことから、環境水はこれらの臨床上問題となる系統に属する大腸菌の温床となっていることが示された。</p> <p>第 5 章は結論であり、本論文で得られた成果について要約し、今後の課題を示している。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、河川水の細菌指標の中でも生物学的・臨床微生物学的に特に重要な大腸菌について、分子生物学的手法を用いてその起源を推定し、病原性や薬剤耐性を網羅的に測定する手法について検討したものである。得られた主な成果は以下のとおりである。

- 1) 起源既知のサンプル（ヒト、ウシ、ブタ、ニワトリ）から単離した大腸菌を対象として、次世代シーケンサーによる DNA 塩基配列の解析によって、それぞれの起源に特異的な遺伝子マーカーを同定した。これらの特定された遺伝子マーカーを標的として、大和川から単離した 531 株の大腸菌株について起源の推定を行った結果、起源が同定されたものの最大の割合はヒト由来 (27.7%) であること、50.7% の大腸菌株はいずれの遺伝子マーカーも保有していなかったこと、河川水から直接 DNA を抽出して遺伝子マーカーの検出を行った場合は、大腸菌自体の濃度が低く遺伝子マーカーを定量できないため、大腸菌を培地で単離する必要があることを示した。
- 2) マルチプレックス PCR 及びデュアルインデックスシーケンシングを用いることで、主要な大腸菌の病原型の同定に必要な 14 種類の病原遺伝子を同時定量する手法を開発した。開発した手法を、大和川から単離した大腸菌株に適用し、12% が腸管外病原性大腸菌であることなどを明らかにした。さらに腸管外病原性大腸菌と分類された株について、起源特異的遺伝子マーカーの検出を行い、起源が分類されたものの内、最大の割合はヒト由来 (28%) であることを示した。
- 3) 大和川から単離した大腸菌 531 株について 25 種類の薬剤を用いた薬剤感受性試験を行い、14.3% が多剤耐性、12.4% が 1 剤もしくは 2 剤耐性、73.3% が感受性株であることを示した。その後、薬剤感受性試験で多剤耐性と判断された大腸菌株や腸管外病原性大腸菌と判断された株について全ゲノム配列の決定を行い、薬剤耐性決定因子の検出及びその系統について解析を行った結果、50 以上の異なる薬剤耐性決定因子が検出された。よって、環境水中の大腸菌は様々な薬剤耐性機構を保有しており、環境水は臨床上問題となる系統に属する大腸菌の温床となっている可能性を示した。

以上の結果は、分子生物学的手法により環境水中の大腸菌の起源、病原性、薬剤耐性が効率良く推定できることを示すものであり、水系感染症の定量的リスク評価手法の確立に大きく貢献するものであって、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 28 年 8 月 2 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。なお、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、平成 29 年 9 月 19 日までの間、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。